

### ESTRAZIONE DI DNA PLASMIDICO BATTERICO

La stessa procedura va seguita in parallelo per ciascuno dei 2 campioni costituiti entrambi da un *pellet* batterico raccolto sul fondo della provetta eppendorf.

**STEP di ri-sospensione:** il pellet batterico va risospeso in **250 $\mu$ l di soluzione S**

**STEP di lisi:** alla risospensione vanno addizionati **250 $\mu$ l di soluzione L**, senza mescolare con la pipetta, si chiude il tappo della provetta e si mescola bene per inversione, poi si lascia **5' a temperatura ambiente** sul banco

**STEP di ri-naturazione:** si aggiungono **350 $\mu$ l di soluzione N**, senza mescolare con la pipetta, si chiude il tappo della provetta e si mescola bene per inversione, poi si lascia **5' in ghiaccio**

**CENTRIFUGAZIONE:** bilanciando le provette nella centrifuga, si centrifuga per 10' a 12000rpm

Il sopranatante che si separa va trasferito in una provetta eppendorf nuova e nel caso non risultasse limpido lo si centrifuga ancora una volta, se risulta limpido, se ne caricano 700 $\mu$ l nella colonnina sistemata all'interno del suo supporto e poi si chiude il tappo.

- si centrifuga a 12000rpm per 1' e poi si scarta nell'apposito recipiente il liquido che è passato sotto (*flow-through*), poi si rimette la colonnina nel supporto
- si caricano nella colonnina 700 $\mu$ l di soluzione W (lavaggio)
- si centrifuga a 12000rpm per 1' poi si scarta nell'apposito recipiente il *flow-through*, poi si rimette la colonnina nel supporto
- **si centrifuga per 1' la colonnina vuota** per togliere l'eccesso di liquido
- **si sposta la colonnina in una provetta nuova da 1,5mL a cui è stato tagliato via il tappo**, si caricano dentro 100 $\mu$ l di soluzione E (eluente)
- si centrifuga a 12000rpm per 1' e si trasferisce il campione in una provetta col tappo contrassegnata per riconoscere il campione

**CONSERVARE I CAMPIONI PER LE ESERCITAZIONI SUCCESSIVE!!!**  
contrassegnandoli bene per riuscire a riconoscerli e ritrovarli fra tutti gli altri campioni

**Stima della concentrazione del DNA plasmidico estratto:**

- sciogliere il gel di agarosio per elettroforesi nel forno a microonde
- preparare una capsulina petri di diametro 3,5cm segnando all'esterno sul fondo 4 quadratini di circa 5mm di lato, 2 per ciascun campione
- prelevare circa 3mL di gel sciolto e colarlo nella capsulina senza introdurre bolle in modo che si formi uno strato di 3-4mm di gel sul fondo della capsulina
- lasciare che si raffreddi e si formi il gel
- depositare nella zona delimitata dai quadratini 1 $\mu$ l e 2 $\mu$ l di DNA plasmidico eluito di ciascun campione
- lasciare asciugare bene e osservare il segnale al transilluminatore